

اثر متابولیت‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها بر تحمل به یخ‌زدگی ژنوتیپ‌های عدس در شرایط کنترل شده

Effect of Metabolites and Antioxidants on Freezing Tolerance of Lentil Genotypes Under Controlled Conditions

جعفر نباتی^۱، احمد نظامی^۲، سیده محبوبه میرمیران^۳، سید سعید حجت^۴ و محمد کافی^۵

- ۱- استادیار، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
- ۲- استادیار، دانشکده کشاورزی و پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
- ۳- استادیار، گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور، تهران ایران.
- ۴- کارشناس، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
- ۵- استادیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهان زراعی و پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۱۲

چکیده

نباتی، ج.، نظامی، ا.، میرمیران، س. م.، حجت، س. س. و کافی، م. ۱۳۹۹. اثر متابولیت‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها بر تحمل به یخ‌زدگی ژنوتیپ‌های عدس در شرایط کنترل شده. *مجله نهال و بذر* ۳۶: ۲۹۹-۲۷۳.

این مطالعه جهت به‌گزینی تحمل به یخ‌زدگی (۱۳-، ۱۵- و ۱۸- درجه سانتیگراد) ۴۰ ژنوتیپ عدس به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی تحت شرایط کنترل شده در سال ۱۳۹۷ در دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر درصد بقا بعد از تنش یخ‌زدگی و محتوای کلروفیل a، کاروتنوئیدها، آنتوسیانین، کربوهیدرات‌های محلول، پرولین، مالون‌دی‌آلدئید، فنل، پروتئین، DPPH، آسکورات پراکسیداز و پراکسیداز قبل از تنش یخ‌زدگی تفاوت معنی‌داری وجود داشت. مدل رگرسیونی نشان داد که کلروفیل b بیشترین تأثیر مثبت و پروتئین و مالون‌دی‌آلدئید بیشترین تأثیر منفی را بر درصد بقا داشتند. تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌ها را به پنج گروه تفکیک کرد. برای بیشتر صفات مورد مطالعه ژنوتیپ‌های گروه چهارم و پنجم نسبت به میانگین کل و ژنوتیپ‌های سایر گروه‌ها برتری داشتند. در گروه چهارم محتوای آنتوسیانین، پروتئین، مالون‌دی‌آلدئید، فنل، پرولین، آسکورات پراکسیداز و پراکسیداز نسبت به میانگین کل و سایر گروه‌ها برتری داشت. درصد بقا، محتوای کلروفیل b، کاروتنوئیدها، کل رنگ‌دانه‌ها و DPPH گروه پنجم نسبت به سایر گروه‌ها برتر بودند. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که ژنوتیپ‌های MLC409، MLC458، MLC469، MLC74، MLC84، MLC169، MLC394، MLC95، MLC17، MLC163 و MLC303 از نظر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و متابولیت‌ها و ژنوتیپ‌های MLC70، MLC410، MLC47، MLC31، MLC91، MLC8، MLC286، MLC407 و MLC472، MLC61، MLC83 و MLC334 از نظر ظرفیت رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی از وضعیت مطلوبی برخوردار هستند. به‌طور کلی، به‌نظر می‌رسد این شاخص‌ها قبل از وقوع تنش سرما اهمیت زیادی در پیش‌بینی تأثیر سرما بر درصد بقا ژنوتیپ‌های عدس دارند.

واژه‌های کلیدی: عدس، درصد بقا، پرولین، رنگ‌دانه، آنتوسیانین

مقدمه

عدس (*Lens culinaris* Medik.) از جمله مهم ترین گیاهان زراعی دیم به ویژه در منطقه خاورمیانه محسوب می شود. چهار کشور عمده تولید کننده عدس هند، کانادا، ترکیه و ایران می باشند (FAO, 2017). این گیاه به علت محتوای پروتئین، مواد معدنی و ویتامین های ارزشمند در دانه و کاش و کلش، به عنوان خوراک انسان و تعلیف دام به ویژه در کشورهای در حال توسعه مورد استفاده قرار می گیرد (Thavarajah et al., 2017).

بر اساس آمار سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (فائو) در سال ۲۰۱۷، سطح زیر کشت این محصول در ایران ۱۳۸/۷ هزار هکتار و میزان عملکرد عدس حدود ۶۰۰ کیلوگرم در هکتار بود (FAO, 2017). پایین بودن و عدم پایداری عملکرد این محصول را می توان ناشی از شیوه های مدیریتی ناکارآمد و پتانسیل پایین عملکرد ارقام و توده های محلی دانست که با به کار گیری و بهبود شیوه های مدیریتی از جمله تغییر در تاریخ کاشت می توان نسبت به رفع آن اقدام نمود.

کاشت عدس معمولاً در اواخر فصل زمستان و اوایل فصل بهار و به صورت دیم انجام می شود. کشت گیاهان در بهار سبب مواجه شدن آنها با گرما و خشکی در طول فصل رشد شده و انجام آبیاری جهت حصول عملکرد مناسب ضروری می باشد. با این وجود کمبود آب در اغلب مناطق کشور سبب کاهش تولید گیاهان

می شود. کاشت زمستانه عدس یک روش مدیریتی مناسب جهت بهبود عملکرد محسوب می شود. این کشت شرایط مناسبی را جهت استفاده بهتر و مؤثرتر از نزولات جوی زمستانه فراهم کرده (Barrios et al., 2016) و همچنین از برخورد گیاه با گرما و خشکی در انتهای فصل ممانعت می کند.

علی رغم مزایای کشت پاییزه، مرگ گیاهان به عنوان یک معضل در این کشت محسوب شده (Homer et al., 2016) و توانایی نمو، رشد مجدد (Caverzan et al., 2016) و تولید محصولات زراعی به شدت تحت تأثیر تنش های نامطلوب محیطی از جمله تنش سرما قرار می گیرد (Rahaie et al., 2013). مطالعات پیشین در ایران حاکی از وجود ژنوتیپ های متحمل به سرما با درصد بقا و عملکرد مناسب در کشت پاییزه است (Bagheri, et al., 2004; Gholami Rezvani et al., 2019).

به همین دلیل در بررسی تحمل به یخ زدگی، بقای گیاهان پس از وقوع یخ زدگی به عنوان معیار ارزیابی جهت تحمل گیاهان به دماهای یخ زدگی مورد بررسی قرار می گیرد. گیاهان کشت پاییزه در بخشی از دوران رشد رویشی خود با شرایط سرما مواجه می شوند که برخی سالها، وقوع سرمای شدید ممکن است آسیب های جبران ناپذیری به گیاه وارد کرده و در بعضی موارد حتی منجر به مرگ گیاه شود (Valizadeh Kamran et al., 2015)، بنابراین شناسایی ارقام متحمل به یخ زدگی عدس جهت

اکسیژن سبب بروز تنش‌های اکسیداتیو در گیاه شده و از رشد و عملکرد گیاه ممانعت می‌نماید (Sharma *et al.*, 2012).

ارتباط بین افزایش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و مقاومت به سرما در گندم زمستانه (*Triticum aestivum* L.) گزارش شده است (Oakley *et al.*, 2018). پروتئین‌های ضد یخ طی فرآیند خوسرمایی در گیاه تجمع یافته و از مسیرهای گوناگون مانند کاهش دمای انجماد، تعدیل یا ممانعت از رشد بلورهای یخ، جلوگیری از تبلور مجدد و محافظت غشایی سلول در برابر آسیب ناشی از دماهای زیر صفر، از گیاه در مقابل سرما محافظت می‌کند (Duman and Wisnieski, 2014). ارتباط بین تجمع این پروتئین‌ها و مقاومت به تنش یخ‌زدگی در گیاهان گزارش شده است (Balamurugan *et al.*, 2018). تجمع پروتئین‌ها در طی خوسرمایی سبب افزایش درصد بقا در گندم و جو (*Hordeum vulgare* L.) رشد یافته در مزرعه شد (Vitamvas *et al.*, 2019). خوسرمایی سبب افزایش میزان کربوهیدرات‌های محلول، کاتالاز، سوپراکسید دسموتاز و آسکوربات پراکسیداز در رقم مقاوم به سرمای گندم شد (Janmohammadi *et al.*, 2012).

نخستین آنزیمی که با گونه‌های فعال اکسیژن مقابله می‌کند، سوپراکسید دسموتاز است که به‌عنوان یک جزء بنیادی سیستم دفاع آنتی

کشت در این نواحی امری ضروری می‌باشد (Barrios *et al.*, 2016).

مواجه شدن گیاه با تنش یخ‌زدگی سبب کاهش میزان کلروفیل برگ، پژمردگی، کلروز و ایجاد تغییرات متابولیکی از جمله کاهش در محتوای اسیدهای چرب غیراشباع و افزایش نفوذپذیری غشای سلولی (Miura and Furumoto, 2013) می‌شود. همچنین سبب اختلال در سیستم انتقال الکترون، کاهش کارایی کوانتومی فتوسیستم II، خسارت به فتوسیستم I، تغییر در چرخه احیای کربن و افزایش تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (Saibo *et al.*, 2009). گیاهان در ساختارهایی مثل کلروپلاست و میتوکندری به‌طور مداوم گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species = ROS) را تولید می‌کنند. ولی این گونه‌ها به‌صورت پیوسته و به روش‌های آنزیمی و غیر آنزیمی توسط سیستم دفاعی پیچیده گیاه، حذف می‌گردند (Pradedova *et al.*, 2011).

سازگاری به تنش سرما در نتیجه سازکارهای پیچیده بیوشیمیایی است که منجر به تجمع پروتئین‌های ضد یخ در آپوپلاست، افزایش قندهای محلول، آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز است (Ma *et al.*, 2010) که با افزایش سطح آن‌ها برای مقابله با تنش اکسیداتیو، توازن احیایی سلول حفظ می‌شود. تغییر تعادل بین تولید و حذف گونه‌های فعال

در مقابله با تنش یخزدگی برخوردار هستند، انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در پاییز و زمستان سال ۱۳۹۶ در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. عوامل مورد بررسی شامل ۴۰ ژنوتیپ منتخب عدس (Bagheri, et al., 2004; Hojjat et al., 2007; Hojjat and Galstyan, 2014; Gholami Rezvani et al., 2019) و سه سطح دمای یخزدگی شامل ۱۳-، ۱۵- و ۱۸- درجه سانتیگراد بودند.

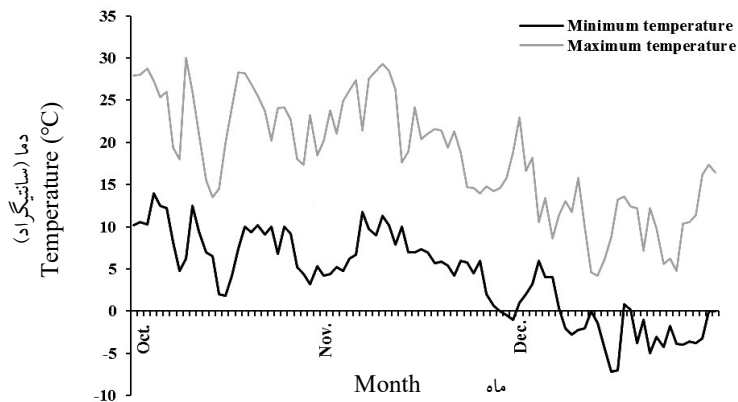
در مهر ۱۳۹۶، بذر ژنوتیپ‌های عدس در عمق یک سانتیمتری گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۱۰ سانتیمتر و ارتفاع ۱۱ سانتیمتر و حاوی ۲۵ درصد حجمی شن و ۷۵ درصد حجمی خاک مزرعه کشت شدند. پس از استقرار کامل گیاهچه‌ها، تعداد ۱۰ بوته در هر گلدان نگهداری شد. گیاهان در شرایط طبیعی و در فضای آزاد رشد یافته و در معرض خوسرمایی قرار گرفتند. آبیاری گلدان‌ها هر دو روز یکبار انجام شد و به منظور اعمال خوسرمایی گیاهان در شرایط طبیعی (شکل ۱) تا مرحله گیاهچه‌ای (حدود چهار تا شش برگگی) رشد کردند.

گیاهان ۲۴ ساعت قبل از اعمال تنش یخزدگی آبیاری شدند و سپس برای اعمال سطوح دماهای یخزدگی در اواسط بهمن به

اکسیدانی در گیاهان، مسئول تبدیل رادیکال‌های سوپراکسید به پراکسید هیدروژن با سرعت بالا می‌باشد (Kim et al., 2012). فعالیت آنزیم‌ها و تجمع کربوهیدرات‌ها همبستگی بالایی با سازگاری به سرما دارند. افزایش میزان کربوهیدرات‌ها به دلیل ارتباط مستقیم آن‌ها با فرآیندهای فیزیولوژیکی از قبیل فتوسنتز، جابجایی عناصر و تنفس نقش مهمی در تحمل به یخزدگی در گیاهان بازی می‌کنند. همبستگی مثبت بین میزان کربوهیدرات‌ها و درجه تحمل به سرما در گیاهان مشاهده شده است (Winifield et al., 2010).

تجمع متابولیت‌های ثانویه مانند فنل‌ها و فلاونوئیدها در طی خوسرمایی و نقش‌های دفاعی و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها در جلوگیری از واکنش‌های اکسیداتیو و افزایش تحمل به تنش یخزدگی در گیاهان گزارش شده است (Schulz et al., 2016). به عبارتی حساسیت و یا تحمل گیاهان با پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی در ارتباط است و گونه‌های گیاهی متحمل از طریق تقویت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، از ظرفیت بهتری برای محافظت گیاه در برابر تنش برخوردار هستند.

بنابراین جهت جلوگیری از مواجهه دوران رشد زایشی گیاه با کمبود آب در انتهای فصل رشد در کشت‌های معمول بهاره و بهره‌مندی از مزایای کشت پاییزه، این پژوهش با هدف به‌گزینی ژنوتیپ‌های منتخب عدس که از درصد بقا و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسب‌تری



شکل ۱- تغییرات دماهای حداقل و حداکثر روزانه مشهد در پاییز ۱۳۹۶

Fig. 1. Daily minimum and maximum temperatures during fall season in 2017-2018, Mashhad, Iran

پاییزه خوسرمایی به صورت طبیعی انجام می‌گیرد (Hincha and Zuther, 2020)، بنابراین بعد از خوسرمایی و قبل از قرارگیری نمونه‌ها در معرض دماهای یخ‌زدگی صفاتی شامل رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی (Dere *et al.*, 1998)، فعالیت مهارکننده رادیکال آزاد (DPPH) (Abe *et al.*, 1998)، مالون دی‌آلدئید (Heath and Parker, 1968)، آنتوسیانین (Wanger, 1979)، فنل کل (Singleton and Rossi, 1965)، فلاونوئید (Chang *et al.*, 2002)، کربوهیدرات‌های محلول (Dubois *et al.*, 1951)، پروتئین محلول (Bates *et al.*, 1973)، پروتئین محلول (Bradford, 1976) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل آسکوربات پراکسیداز (Yamaguchi *et al.*, 1995) و پراکسیداز

فریزر ترموگرادیان منتقل شدند. دمای فریزر در ابتدای آزمایش پنج درجه سانتیگراد بود و پس از قرار دادن نمونه‌ها با سرعت دو درجه سانتیگراد در ساعت کاهش یافت. به‌منظور ایجاد هستک یخ در گیاه و اجتناب از بروز پدیده فراسرما، در دمای ۲- درجه سانتیگراد، پاشش باکتری‌های ایجاد کننده هستک یخ (Ice Nucleation Active Bacteria = INAB) روی گیاهان انجام شد (Wisniewski *et al.*, 2002). گیاهچه‌ها در هر تیمار دمایی به مدت یک ساعت نگهداری و سپس به مدت ۲۴ ساعت به اتاقک سرد با دمای 5 ± 2 درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

با توجه به اینکه خوسرمایی یکی از مولفه‌های مهم در بهبود تحمل به سرما در کشت‌های پاییزه است و در گیاهان

(Sreenivasulu *et al.*, 1999) بررسی شدند. STATISTICA8 استفاده شد.

نتایج و بحث

ژنوتیپ‌های عدس مورد مطالعه از نظر غلظت کلروفیل a و کاروتنوئیدها قبل از تنش یخزدگی تفاوت معنی داری داشتند (جدول ۱). دامنه محتوای کلروفیل a در بین ژنوتیپ‌ها بین ۰/۳۰۲ تا ۰/۷۵۵ میلی گرم به ازای هر گرم وزن تر متغیر بود و تفاوت ۶۰ درصدی بین بیشترین و کمترین غلظت کلروفیل a مشاهده شد. تنها ۲۳ درصد از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از محتوای کلروفیل کمتر از ۰/۵ میلی گرم در گرم وزن تر برخوردار بودند. تفاوت ۷۱ درصدی نیز بین بیشترین (MLC91) و کمترین (MLC163) غلظت کاروتنوئیدها مشاهده شد. بیشترین محتوای کلروفیل a و کاروتنوئیدها متعلق به MLC91 بود (جدول ۲).

جهت ارزیابی درصد بقا، گلدان‌ها به گلخانه منتقل شدند و پس از چهار هفته درصد بقا و وزن خشک آن‌ها تعیین شد. درصد بقا از طریق شمارش تعداد بوته زنده در هر گلدان و از طریق رابطه ۱ محاسبه شد.

$$S = \frac{N_2}{N_1} \times 100 \quad \text{(رابطه ۱)}$$

در این رابطه S درصد بقا، N_1 تعداد گیاهان قبل از تیمار یخزدگی و N_2 تعداد گیاهان زنده بعد چهار هفته از اعمال تیمار یخزدگی می‌باشد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. برای برآورد همبستگی، تجزیه خوشه‌ای (بر اساس روش ward) و تجزیه رگرسیون گام به گام از نرم‌افزار JMP4 و برای تجزیه به مؤلفه‌های اصلی از نرم‌افزار

جدول ۱- تجزیه واریانس برای رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی، آنتوسیانین، کربوهیدرات‌های محلول

و پرولین در ژنوتیپ‌های عدس قبل از اعمال یخزدگی در شرایط کنترل شده

Table 1. Analysis of variance for photosynthesis pigments, anthocyanin, soluble carbohydrates and proline in lentil genotypes before freezing stress under controlled conditions

| درجه منبع تغییر S.O.V. | df | کلروفیل a Cha | کلروفیل b Chb | کاروتنوئیدها Carotenoids | کلروفیل a/b Cha/Chb | کل | کربوهیدرات‌های | | پرولین Proline |
|------------------------------|----|------------------|------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| | | | | | | رنگ‌دانه‌ها Total pigment | آنتوسیانین Anthocyanin | محلول Soluble carbohydrates | |
| Genotype ژنوتیپ | 39 | 0.031** | 0.005 | 0.005** | 0.154 | 0.064 | 0.046** | 0.250** | 0.956** |
| Error خطا | 80 | 0.012 | 0.003 | 0.001 | 0.116 | 0.048 | 0.010 | 0.025 | 0.078 |
| ضرب تغییرات (%) C.V. (%) | - | 19.3 | 17.4 | 20.9 | 19.3 | 20.4 | 21.7 | 19.7 | 22.3 |

** : Significant at the 1% probability level.

** : معنی دار در سطح احتمال یک درصد.

Cha: Chlorophyll a, Chb: Chlorophyll b

جدول ۲- میزان کلروفیل a، کاروتنوئیدها، آنتوسیانین، کربوهیدرات‌های محلول و پرولین در ژنوتیپ‌های عدس قبل از اعمال یخ‌زدگی در شرایط کنترل‌شده

Table 2. Chlorophyll a, carotenoids, anthocyanin, soluble carbohydrates and proline content in lentil genotypes before freezing stress under controlled conditions

| ژنوتیپ Genotype | کلروفیل a (میلی گرم در گرم وزن تر) | کاروتنوئیدها (میلی گرم در گرم وزن تر) | آنتوسیانین (میلی مول در گرم وزن تر) Anthocyanin | کربوهیدرات‌های محلول (میلی گرم در گرم وزن تر) Soluble carbohydrates | پرولین (میلی گرم در گرم وزن تر) Proline |
|--------------------|---------------------------------------|--|---|---|---|
| | Cha (mg gfw ⁻¹) | Carotenoids (mg gfw ⁻¹) | (mmol gfw ⁻¹) | (mg gfw ⁻¹) | (mg gfw ⁻¹) |
| MLC8 | 0.693ab | 0.209a-f | 0.590a-e | 0.798c-k | 0.921j-m |
| MLC9 | 0.391fg | 0.105kl | 0.382f-k | 0.587i-k | 0.973i-m |
| MLC11 | 0.625a-e | 0.142g-k | 0.675a-d | 0.531jk | 1.04h-m |
| MLC12 | 0.512b-g | 0.155e-k | 0.760a | 0.593i-k | 0.873j-m |
| MLC13 | 0.485b-g | 0.107kl | 0.556b-g | 0.611h-k | 0.857k-m |
| MLC16 | 0.615a-e | 0.138g-k | 0.334h-k | 1.03b-e | 0.785lm |
| MLC17 | 0.645a-d | 0.161c-k | 0.727ab | 0.775d-k | 0.864j-m |
| MLC22 | 0.496b-g | 0.155e-k | 0.358g-k | 0.824c-k | 0.793lm |
| MLC29 | 0.421e-g | 0.113j-l | 0.465e-j | 0.739e-k | 1.290f-l |
| MLC31 | 0.581a-f | 0.162c-k | 0.472e-j | 1.420a | 0.985h-m |
| MLC33 | 0.665a-d | 0.224a-c | 0.224k | 0.631g-k | 0.518m |
| MLC38 | 0.444d-g | 0.104kl | 0.388f-k | 0.759e-k | 0.887j-m |
| MLC47 | 0.604a-f | 0.185b-i | 0.434e-j | 0.817c-k | 0.929j-m |
| MLC55 | 0.503b-g | 0.132h-l | 0.372f-k | 0.708f-k | 0.929j-m |
| MLC61 | 0.629a-e | 0.219a-d | 0.570b-f | 0.975b-f | 1.540d-h |
| MLC70 | 0.596a-f | 0.163c-k | 0.510d-h | 0.707f-k | 1.690c-f |
| MLC71 | 0.302g | 0.107kl | 0.511d-h | 0.224l | 0.829k-m |
| MLC74 | 0.674a-c | 0.193b-h | 0.460e-j | 0.808c-k | 2.040cd |
| MLC81 | 0.580a-f | 0.184b-i | 0.290jk | 0.897c-i | 1.420f-j |
| MLC83 | 0.631a-e | 0.186b-i | 0.611a-e | 0.849c-j | 1.500e-i |
| MLC84 | 0.614a-e | 0.196b-g | 0.425e-j | 0.827c-k | 2.170bc |
| MLC91 | 0.755a | 0.262a | 0.446e-j | 1.450a | 0.889j-m |
| MLC95 | 0.582a-f | 0.111j-l | 0.357g-k | 0.974b-f | 2.010c-e |
| MLC103 | 0.391fg | 0.112j-l | 0.326h-k | 0.793c-k | 0.944j-m |
| MLC151 | 0.554a-f | 0.147f-k | 0.439e-j | 1.10bc | 1.010h-m |
| MLC163 | 0.632a-e | 0.076l | 0.456e-j | 1.07b-d | 0.761lm |
| MLC169 | 0.486b-g | 0.125i-l | 0.563b-f | 0.922c-h | 1.310f-l |
| MLC253 | 0.459c-g | 0.136g-l | 0.305i-k | 0.529k | 1.130g-l |
| MLC286 | 0.749a | 0.236ab | 0.504d-i | 0.826c-k | 1.290f-l |
| MLC303 | 0.558a-f | 0.159d-k | 0.320h-k | 1.450a | 0.908j-m |
| MLC334 | 0.638a-e | 0.190b-h | 0.709a-c | 0.946c-g | 1.090g-l |
| MLC337 | 0.501b-g | 0.177b-i | 0.411e-k | 0.609h-k | 1.620d-g |
| MLC394 | 0.506b-g | 0.157d-k | 0.496d-i | 1.250ab | 1.140f-l |
| MLC407 | 0.624a-e | 0.174b-j | 0.503d-i | 0.743e-k | 1.250f-l |
| MLC409 | 0.699ab | 0.224a-c | 0.521c-h | 0.656g-k | 1.520e-i |
| MLC410 | 0.606a-f | 0.211a-e | 0.285jk | 0.599i-k | 0.905j-m |
| MLC454 | 0.553a-f | 0.158d-k | 0.474e-j | 0.710f-k | 1.110g-l |
| MLC458 | 0.593a-f | 0.183b-i | 0.508d-h | 0.935c-g | 3.510a |
| MLC469 | 0.641a-e | 0.155e-k | 0.556b-g | 0.561jk | 2.540b |
| MLC472 | 0.701ab | 0.195b-h | 0.428e-j | 0.718e-k | 1.370f-k |

میانگین‌هایی، در هر ستون، که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌دار ندارند. Means, in each column, followed by at least one letter in common are not significantly different at the 5% probability level- using Duncan's Multiple Range Test.

Cha: Chlorophyll a

این شاخص تاحدی می‌تواند برای تفکیک ژنوتیپ‌های حساس از متحمل در شرایط تنش مورد استفاده قرار گیرد. همچنین حفظ ساختار کلروفیل در شرایط تنش دمای پایین از طریق حفظ ثبات فتوسنتزی سبب بهره‌گیری بیشتر گیاه از نور شده و از طریق افزایش ذخایر کربوهیدراتی سبب ایجاد مقاومت گیاه به تنش سرما و در نتیجه افزایش درصد بقا در گیاهان می‌شود.

دامنه تغییرات آنتوسیانین از ۰/۲۲۴ (MLC33) تا ۰/۷۶۰ (MLC12) میلی‌مول بر گرم ماده تر متغیر بود (جدول ۲). حدود ۶۰ درصد ژنوتیپ‌ها از میزان آنتوسیانین کمتر از ۰/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برخوردار بودند (جدول ۲). آنتوسیانین جزء متابولیت‌های ثانویه است که نقش مهمی در تولید رنگ در گل‌ها، میوه‌ها و بافت رویشی گیاهان دارد و اثر آنتی‌اکسیدانی قوی دارد (Potapovich and Kostyuk, 2003).

بیوسنتز آنتوسیانین‌ها نه تنها در شرایط عادی بلکه به تنش‌های محیطی مانند نور، کاهش مواد مغذی و دمای پایین نیز انجام می‌شود. گزارش شده است که تنش سرما عامل مهمی در افزایش تولید آنتوسیانین بسیاری از گیاهان از جمله کلزا است (Ahmed et al., 2015) و افزایش آن موجب بهبود تحمل به سرما در این گیاهان گردید. آنتوسیانین‌ها رنگیزه محافظ بوده که به وسیله حذف مستقیم گونه‌های فعال اکسیژن در طول

هرچند از لحاظ محتوای کلروفیل b، نسبت کلروفیل a به b و غلظت کل رنگیزه‌های فتوسنتزی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تفاوتی وجود نداشت، اما همبستگی مثبت و معنی‌داری بین محتوای کلروفیل b و کل رنگیزه‌های فتوسنتزی با درصد بقا مشاهده شد (جدول‌های ۳ و ۴). در میان رنگیزه‌های فتوسنتزی، کلروفیل b بیشترین سهم را در حفظ بقای بالاتر به خود اختصاص داد. در کلروپلاست‌ها الکترون حاصل تجزیه آب در لومن به NADP^+ در استروما انتقال می‌یابد که حاصل این فرایند انجام فتوسنتز است. علاوه بر این مسیر اصلی، بر اساس اندازه‌گیری‌های عملکردی، مسیرهای انتقال الکترون جایگزین، شامل احیای غیر فتوشیمیایی یا اکسیداسیون پلاستوکینون‌ها در مصرف، دهنده‌ها یا پذیرنده‌های الکترون نیز گزارش شده است (Johnson, 2005).

در شرایط تنش سرما واکنش‌های شیمیایی جهت دریافت و انتقال الکترون به شدت کاهش می‌یابد و وجود الکترون آزاد موجب خسارت‌های اکسیداتی در قسمت‌های مختلف دستگاه فتوسنتزی خواهد شد. در این راستا وجود رنگ‌دانه‌های کمکی مانند کلروفیل b که وظیفه حافظتی دارند گیاه را قادر می‌سازد تا در شرایطی که امکان استفاده از الکترون‌ها موجود نیست با کاهش میزان الکترون آزاد موجب افزایش تحمل گیاه به تنش یخ‌زدگی گردد (Paredes and Quiles, 2015). به نظر می‌رسد

جدول ۳- ضرایب همبستگی صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های عدس در دمای ۱۳- درجه سانتیگراد (بالای قطر) و دمای ۱۵- درجه سانتیگراد (پایین قطر)

Table 3. Correlation coefficients between studied traits of lentil genotypes at -13 °C (above diameter) and -15 °C (below diameter)

| ردیف NO. | Parameters | پارامتر | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
|-------------|-----------------------|----------------------|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|-------|
| 1 | Survival | بقا | 1 | -0.07 | -0.03 | 0.09 | -0.10 | -0.11 | 0.01 | -0.09 | 0.01 | -0.17 | -0.23* | 0.12 | -0.01 | 0.04 | -0.21* | -0.08 | -0.06 |
| 2 | Dry weight | وزن خشک | -0.11 | 1 | -0.15 | -0.12 | -0.25** | -0.06 | -0.14 | -0.14 | -0.11 | -0.07 | 0.18 | -0.23* | -0.14 | -0.22* | -0.09 | -0.10 | -0.10 |
| 3 | Cha | کلروفیل a | 0.14 | -0.23* | 1 | 0.50** | 0.71** | 0.66** | 0.91** | 0.12 | 0.29** | -0.06 | 0.08 | 0.23* | -0.03 | 0.18* | 0.18* | 0.04 | 0.08 |
| 4 | Chb | کلروفیل b | 0.24** | -0.20* | 0.50** | 1 | 0.15 | -0.12 | 0.68** | 0.07 | 0.26** | 0.07 | 0.03 | 0.17 | -0.14 | 0.35** | 0.10 | 0.02 | 0.22* |
| 5 | Carotenoids | کاروتنوئیدها | 0.01 | -0.27** | 0.71** | 0.15 | 1 | 0.65** | 0.61** | 0.08 | 0.17 | 0.05 | -0.03 | 0.17 | 0.13 | 0.13 | 0.14 | 0.10 | 0.04 |
| 6 | Cha/b | نسبت کلروفیل a/b | 0.01 | -0.09 | 0.66** | -0.12 | 0.65** | 1 | 0.55** | 0.09 | 0.12 | -0.07 | 0.10 | 0.09 | 0.09 | -0.02 | 0.17 | 0.07 | -0.02 |
| 7 | Total pigments | رنگدانه کل | 0.19* | -0.21* | 0.91** | 0.68** | 0.61** | 0.55** | 1 | 0.16 | 0.31** | -0.01 | 0.11 | 0.29** | -0.06 | 0.25** | 0.15 | 0.06 | 0.18* |
| 8 | Anthocyanin | آنتوسانینها | 0.03 | 0.03 | 0.12 | 0.07 | 0.08 | 0.09 | 0.16 | 1 | 0.13 | -0.05 | 0.20* | 0.01 | 0.09 | 0.12 | -0.04 | 0.21* | 0.09 |
| 9 | DPPH | مهار رادیکال آزاد | 0.10 | -0.18* | 0.29** | 0.26** | 0.17 | 0.12 | 0.31** | 0.13 | 1 | 0.10 | 0.21* | 0.47** | -0.02 | 0.17 | 0.14 | 0.01 | -0.03 |
| 10 | Protein | پروتئین | 0.07 | -0.08 | -0.06 | 0.07 | 0.05 | -0.07 | -0.01 | -0.05 | 0.10 | 1 | 0.11 | -0.05 | -0.01 | 0.02 | -0.01 | 0.17 | 0.13 |
| 11 | MDA | مالون دی آلدئید | -0.02 | -0.04 | 0.08 | 0.03 | -0.03 | 0.10 | 0.11 | 0.20* | 0.21* | 0.11 | 1 | 0.03 | 0.19* | 0.18* | 0.11 | 0.22* | 0.11 |
| 12 | Phenol | فنل | 0.17 | -0.07 | 0.23* | 0.17 | 0.17 | 0.09 | 0.29** | 0.01 | 0.47** | -0.05 | 0.03 | 1 | -0.05 | 0.11 | 0.17 | 0.07 | 0.07 |
| 13 | Flavonoids | فلاونوئید | -0.15 | 0.05 | -0.03 | -0.14 | 0.14 | 0.09 | -0.06 | 0.09 | -0.02 | -0.01 | 0.19* | -0.05 | 1 | 0.01 | -0.12 | 0.04 | -0.03 |
| 14 | Proline | پرولین | 0.08 | -0.10 | 0.18* | 0.35** | 0.13 | -0.02 | 0.25** | 0.12 | 0.17 | 0.02 | 0.18* | 0.11 | 0.01 | 1 | 0.01 | 0.06 | 0.16 |
| 15 | Soluble carbohydrates | کربوهیدرات های محلول | 0.07 | -0.29** | 0.18* | 0.10 | 0.14 | 0.17 | 0.15 | -0.04 | 0.14 | -0.01 | 0.11 | 0.17 | -0.12 | 0.01 | 1 | 0.06 | 0.07 |
| 16 | Ascorbate peroxidase | آسکوربات پراکسیداز | 0.13 | -0.21* | 0.04 | 0.02 | 0.10 | 0.07 | 0.06 | 0.21* | 0.01 | 0.17 | 0.22* | 0.07 | 0.04 | 0.06 | 0.06 | 1 | 0.19* |
| 17 | Peroxidase | پراکسیداز | 0.07 | 0.03 | 0.08 | 0.22* | 0.04 | -0.02 | 0.18* | 0.09 | -0.03 | 0.13 | 0.11 | 0.07 | -0.03 | 0.16 | 0.07 | 0.19* | 1 |

* and **: Significant at the 5%, and 1%, probability levels, respectively.

* و **: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

جدول ۴- ضرایب همبستگی صفات مورد مطالعه ژنوتیپ‌های عدس در دمای ۱۸- درجه سانتیگراد

Table 4. Correlation coefficients between studied traits of lentil genotypes at -18 °C

| ردیف NO. | Parameters | پارامتر | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
|-------------|-----------------------|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|------|------|-------|----|
| 1 | Survival | بقا | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | Dry weight | وزن خشک | 0.77** | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | Cha | کلر فیل a | 0.07 | 0.03 | 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | Chb | کلر فیل b | 0.16 | 0.10 | 0.50** | 1 | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | Carotenoids | کاروتنوئید ها | 0.01 | 0.01 | 0.71** | 0.15 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 6 | Cha/b | نسبت کلروفیل a/b | 0.03 | 0.04 | 0.66** | -0.12 | 0.65** | 1 | | | | | | | | | | | |
| 7 | Total pigments | رنگدانه کل | 0.11 | 0.09 | 0.91** | 0.68** | 0.61** | 0.55** | 1 | | | | | | | | | | |
| 8 | Anthocyanin | آنتوسیانین ها | 0.14 | 0.14 | 0.12 | 0.07 | 0.08 | 0.09 | 0.16 | 1 | | | | | | | | | |
| 9 | DPPH | مهار رادیکال آزاد | 0.13 | 0.01 | 0.29** | 0.26** | 0.17 | 0.12 | 0.31** | 0.13 | 1 | | | | | | | | |
| 10 | Protein | پروتئین | -0.15 | -0.07 | -0.06 | 0.07 | 0.05 | -0.07 | -0.01 | -0.05 | 0.10 | 1 | | | | | | | |
| 11 | MDA | مالون دی آلدئید | -0.17 | 0.01 | 0.08 | 0.03 | -0.03 | 0.10 | 0.11 | 0.20* | 0.21* | 0.11 | 1 | | | | | | |
| 12 | Phenol | فنل | 0.07 | 0.04 | 0.23* | 0.17 | 0.17 | 0.09 | 0.29** | 0.01 | 0.47** | -0.05 | 0.03 | 1 | | | | | |
| 13 | Flavonoids | فلاونوئید | -0.11 | 0.04 | -0.03 | -0.14 | 0.14 | 0.09 | -0.06 | 0.09 | -0.02 | -0.01 | 0.19* | -0.05 | 1 | | | | |
| 14 | Proline | پروлін | 0.12 | 0.31** | 0.18* | 0.35** | 0.13 | -0.02 | 0.25** | 0.12 | 0.17 | 0.02 | 0.18* | 0.11 | 0.01 | 1 | | | |
| 15 | Soluble carbohydrates | کربوهیدرات های محلول | -0.13 | -0.14 | 0.18* | 0.10 | 0.14 | 0.17 | 0.15 | -0.04 | 0.14 | -0.01 | 0.11 | 0.17 | -0.12 | 0.01 | 1 | | |
| 16 | Ascorbate peroxidase | آسکوربات پراکسیداز | 0.11 | 0.26** | 0.04 | 0.02 | 0.10 | 0.07 | 0.06 | 0.21* | 0.01 | 0.17 | 0.22* | 0.07 | 0.04 | 0.06 | 0.06 | 1 | |
| 17 | Peroxidase | پراکسیداز | 0.07 | 0.14 | 0.08 | 0.22* | 0.04 | -0.02 | 0.18* | 0.09 | -0.03 | 0.13 | 0.11 | 0.07 | -0.03 | 0.16 | 0.07 | 0.19* | 1 |

* and **: Significant at the 5%, and 1%, probability levels, respectively.

* و **: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

عمده‌ای دارند (Atici and Nalbantoglu, 2003). هرچند در این آزمایش همبستگی مستقیمی بین تجمع کربوهیدرات‌های محلول و مقاومت به یخ‌زدگی مشاهده نشد (جدول‌های ۳ و ۴) اما در بررسی تجزیه خوشه‌ای صفات مورد مطالعه ژنوتیپ‌های گروه اول که از نظر تحمل به یخ‌زدگی نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها برتر بودند، از نظر مقدار کربوهیدرات‌های محلول از میانگین بالاتری برخوردار بودند (شکل ۲ و جدول ۵). به‌طور کلی از افزایش محتوای کربوهیدرات‌های محلول می‌توان به‌عنوان یک شاخص فیزیولوژیک مناسب برای ارزیابی ژنوتیپ‌های متحمل به سرما استفاده کرد.

نتایج نشان دهنده سنتز مقادیر متفاوت پرولین در شرایط خوسرمایی در بین ژنوتیپ‌های عدس مورد مطالعه بود. تفاوت ۸۵ درصدی پ بین حداکثر و حداقل محتوای پرولین در ژنوتیپ‌های عدس مشاهده شد. در این میان ژنوتیپ‌های MLC458 و MLC469 با سنتز مقادیر بالای پرولین دارای اختلاف قابل توجهی نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها بودند (جدول ۲). تجمع پرولین نقش مهمی در ایجاد تحمل در گیاهان تحت شرایط تنش ایفا می‌کند (Awasthi *et al.*, 2015). افزایش مقدار پرولین در گیاهچه‌های لویا تحت تنش یخ‌زدگی نیز گزارش شده است (Soliman *et al.*, 2018).

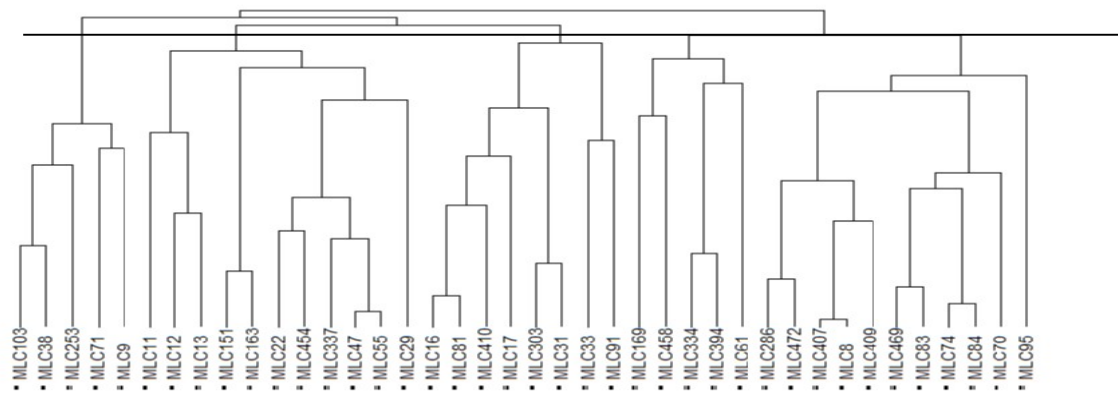
پرولین از طریق تنظیم اسمزی، حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن و جلوگیری از

تنش اکسیداتیو از گیاه در برابر تنش محافظت می‌کند (Zhang *et al.*, 2010).

بررسی میزان محتوای کربوهیدرات‌های محلول در ۴۰ ژنوتیپ عدس مورد مطالعه نشان داد که تنها ژنوتیپ MLC71 از محتوای کربوهیدرات‌های محلول کمتر از ۰/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برخوردار بود و تفاوت ۸۵ درصدی بین محتوای کربوهیدرات‌های محلول این ژنوتیپ با دو ژنوتیپ MLC91 و MLC303 که از بیشترین محتوای کربوهیدرات‌های محلول برخوردار بودند، مشاهده شد (جدول ۲).

رابطه مثبتی بین محتوای کربوهیدرات‌های محلول با محتوای کلروفیل مشاهده شد (جدول‌های ۳ و ۴). به‌عبارتی ژنوتیپ‌های مقاوم به تنش یخ‌زدگی از طریق حفظ ساختار کلروفیل و افزایش فعالیت‌های فتوسنتزی سبب افزایش تولید محتوای کربوهیدرات‌های محلول در گیاه می‌شوند. تجمع کربوهیدرات‌های محلول به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اسمزی از طریق حفظ ساختار غشا از گیاه در برابر شرایط تنش یخ‌زدگی محافظت کرده و سبب افزایش میزان تحمل گیاه در برابر تنش یخ‌زدگی می‌شوند (Gusta and Wisniewski, 2013).

به‌طور کلی، کربوهیدرات‌های محلول از طریق کاهش دمای انجماد آب سلولی، کاهش پسابدگی سلول‌ها در مقابل تشکیل یخ‌های بین سلولی و محافظت از ساختمان و نحوه عمل پروتئین‌ها در ایجاد مقاومت به سرما نقش



شکل ۲- گروه‌بندی خوشه‌ای ژنوتیپ‌های عدس بر اساس صفات مورد مطالعه تحت شرایط کنترل شده
Fig. 2. Cluster grouping of lentil genotypes based on studied traits under controlled conditions

جدول ۵- میانگین و انحراف از میانگین برای گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای برای صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های عدس تحت شرایط کنترل شده

Table 5. Mean and deviation from mean for groups in cluster analysis of traits in lentil genotypes under controlled conditions

| ردیف No. | Trait | ژنوتیپ Genotypes (MLC) | Group | | | | | | | | | | | |
|-------------|--|--|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------|---------------------|
| | | | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | | |
| | | | میانگین از میانگین گروه | انحراف از میانگین گروه | میانگین از میانگین گروه | انحراف از میانگین گروه | میانگین از میانگین گروه | انحراف از میانگین گروه | میانگین از میانگین گروه | انحراف از میانگین گروه | میانگین از میانگین گروه | انحراف از میانگین گروه | | |
| | | | 103, 38, 253, 71, 9 | | 11, 12, 13, 151, 163, 22, | | 16, 81, 410, 17, | | 169, 458, 334, 394, 61 | | 286, 472, 407, 8, 409, | | 469, 83, 74, 84, 70, 95 | |
| | | | Group mean | Deviation from mean | Group mean | Deviation from mean | Group mean | Deviation from mean | Group mean | Deviation from mean | Group mean | Deviation from mean | Group mean | Deviation from mean |
| 1 | Survival (%) | درصد بقا | 76.600 | 2.140 | 69.100 | -5.350 | 72.900 | -1.460 | 73.100 | -1.360 | 80.500 | 6.060 | | |
| 2 | Dry weight (mg plant ⁻¹) | وزن خشک (گرم در گیاه) | 16.500 | 2.380 | 14.900 | 0.769 | 12.300 | -1.830 | 14.600 | 0.484 | 13.400 | -0.737 | | |
| 3 | Cha (mg gfw ⁻¹) | کلرفیل a (میلی گرم بر گرم وزن تر) | 0.397 | -0.176 | 0.535 | -0.038 | 0.625 | 0.050 | 0.570 | -0.003 | 0.655 | 0.082 | | |
| 4 | Chb (mg gfw ⁻¹) | کلرفیل b (میلی گرم بر گرم وزن تر) | 0.303 | -0.025 | 0.299 | -0.028 | 0.328 | -0.0003 | 0.327 | -0.001 | 0.368 | 0.041 | | |
| 5 | Carotenoids (mg gfw ⁻¹) | کاروتنوئید ها (میلی گرم بر گرم وزن تر) | 0.113 | -0.050 | 0.141 | -0.023 | 0.188 | 0.024 | 0.175 | 0.011 | 0.185 | 0.022 | | |
| 6 | Cha/b | نسبت کلروفیل a/b | 1.360 | -0.398 | 1.780 | 0.018 | 1.890 | 0.129 | 1.800 | 0.045 | 1.810 | 0.049 | | |
| 7 | Total pigment (mg gfw ⁻¹) | رنگدانه کل (میلی گرم بر گرم وزن تر) | 0.811 | -0.258 | 0.999 | -0.069 | 1.120 | 0.052 | 1.090 | 0.025 | 1.210 | 0.137 | | |
| 8 | Anthocyanin (mmol gfw ⁻¹) | آنتوسیانین ها (میلی مول بر گرم وزن تر) | 0.382 | -0.086 | 0.490 | 0.023 | 0.387 | -0.081 | 0.569 | 0.101 | 0.497 | 0.029 | | |
| 9 | DPPH (mg gfw ⁻¹) | مهار رادیکال آزاد (میلی گرم بر گرم وزن تر) | 0.666 | -0.152 | 0.764 | -0.053 | 0.621 | -0.196 | 0.965 | 0.148 | 1.020 | 0.198 | | |
| 10 | Protein (mg gfw ⁻¹) | پروتئین (میلی گرم بر گرم وزن تر) | 13.400 | 2.350 | 9.49 | -1.590 | 8.350 | -2.730 | 17.300 | 6.220 | 10.800 | -0.316 | | |
| 11 | MDA (nmol gfw ⁻¹) | مالون دی آلدئید (نانومول بر گرم وزن تر) | 29.200 | -13.700 | 50.200 | 7.300 | 32.500 | -10.400 | 57.800 | 14.900 | 42.600 | -0.264 | | |
| 12 | Phenol (mg gfw ⁻¹) | فیل (میلی گرم بر گرم وزن تر) | 64.000 | -6.920 | 64.900 | -6.050 | 68.500 | -2.440 | 84.400 | 13.400 | 75.800 | 4.880 | | |
| 13 | Flavonoids (mg gfw ⁻¹) | فلاونوئید (میلی گرم بر گرم وزن تر) | 0.031 | -0.0003 | 0.032 | 0.0002 | 0.031 | -3.5E-05 | 0.032 | 7.83E-05 | 0.031 | -2.9E-05 | | |
| 14 | Proline (mg gfw ⁻¹) | پرولین (میلی گرم بر گرم وزن تر) | 0.952 | -0.301 | 1.020 | -0.234 | 0.910 | -0.343 | 1.720 | 0.465 | 1.660 | 0.409 | | |
| 15 | Soluble carbohydrates (mg gfw ⁻¹) | کربوهیدرات محلول (میلی گرم بر گرم وزن تر) | 0.578 | -0.225 | 0.681 | -0.122 | 1.030 | 0.228 | 1.010 | 0.202 | 0.770 | -0.034 | | |
| 16 | Ascorbate peroxidase (unit gfw ⁻¹) | آسکوربات پراکسیداز (واحد بر گرم وزن تر) | 0.067 | 0.004 | 0.057 | -0.007 | 0.055 | -0.009 | 0.107 | 0.044 | 0.054 | -0.009 | | |
| 17 | Peroxidase (unit gfw ⁻¹) | پراکسیداز (واحد بر گرم وزن تر) | 17.500 | -2.200 | 18.500 | -1.140 | 21.100 | 1.450 | 24.10 | 4.390 | 18.800 | -0.907 | | |

از طریق حفظ ساختار کلروفیل و فعالیت تنظیم کننده‌های اسمزی نظیر پرولین (به‌عنوان جاروب کننده گونه‌های فعال اکسیژن) با تنش مقابله می‌کنند.

از نظر غلظت مالون‌دی‌آلدئید تولید شده در شرایط خوسرمایی بین ژنوتیپ‌های عدس مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۶). تفاوت ۷۶ درصدی بین بیشترین (MLC151) و کمترین (MLC103) مقدار مالون‌دی‌آلدئید در ژنوتیپ‌های عدس مورد مطالعه مشاهده شد (جدول ۷). از مالون‌دی‌آلدئید که از شکست ثانویه لیپید هیدروپراکسیدهای اولیه ناشی می‌شود، می‌توان به‌عنوان یک نشانگر جهت مشخص کردن مقدار خسارت ناشی از صدمات پراکسیدها تولید شده حاصل از تنش استفاده کرد (Davey et al., 2005). به‌عبارتی هرچه مقدار مالون‌دی‌آلدئید بالاتر باشد به معنای خسارت بیشتر به غشاهای سلولی است.

تخریب آنزیم‌ها از گیاه در برابر تنش یخ‌زدگی محافظت می‌کند. افزایش پرولین در نتیجه افزایش گاما-گلوتامین کیناز و کاهش فعالیت پرولین اکسیداز، سبب حفظ پتانسیل اسمزی لازم جهت حفظ فعالیت‌های فیزیولوژیکی حیاتی در گیاه می‌شود (Khan et al., 2013). همچنین تجمع پرولین به‌عنوان یک متابولیت ضروری در تحمل تنش در گندم نیز گزارش شده است (Apostolova et al., 2008).

در این مطالعه، رابطه مثبت و معنی‌داری بین محتوای پرولین با کلروفیل‌های a و b و مالون‌دی‌آلدئید مشاهده شد. هر چند ارتباط معنی‌داری بین محتوای پرولین با درصد بقا مشاهده نشد (جدول‌های ۳ و ۴). در بررسی تجزیه خوشه‌ای صفات مورد بررسی مقدار پرولین تنها در ژنوتیپ‌های گروه یک بیشتر از میانگین بود و ژنوتیپ‌های سایر گروه‌ها از نظر پرولین از مقدار کمتری نسبت به میانگین کل برخوردار بودند (جدول ۵). ژنوتیپ‌های مقاوم

جدول ۶- تجزیه واریانس برای مالون‌دی‌آلدئید، فنل، فلاونوئیدها، پروتئین، مهار رادیکال آزاد DPPH، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در ژنوتیپ‌های عدس قبل از اعمال یخ‌زدگی در شرایط کنترل شده
Table 6. Analysis of variance for malondialdehyde (MDA), phenol, flavonoids, protein, DPPH, ascorbate peroxidase (APX) and peroxidase (POX) in lentil genotypes before freezing stress under control conditions

| S.O.V. | منبع تغییر | درجه | | فل | فلاونوئید | پروتئین | مهار رادیکال آزاد | آسکوربات | پراکسیداز |
|----------|------------------|-------|-----------------|--------|------------|---------|-------------------|----------|-----------|
| | | آزادی | مالون‌دی‌آلدئید | | | | | | |
| | | df | MDA | Phenol | Flavonoids | Protein | DPPH | APX | POX |
| Genotype | ژنوتیپ | 39 | 775** | 383* | 0.001 | 165** | 0.156** | 0.003** | 47.4** |
| Error | خطا | 80 | 100 | 219 | 0.00 | 3.76 | 0.029 | 0.00 | 17.4 |
| | ضریب تغییرات (%) | - | 23.3 | 20.9 | 1.00 | 17.5 | 20.7 | 21.9 | 21.4 |

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد. * and **: Significant at the 5%, and 1%, probability levels, respectively.

جدول ۷- مقایسه میانگین غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، فنل، پروتئین، مهار فعالیت رادیکال آزاد (DPPH)،

آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در ژنوتیپ‌های عدس قبل از اعمال یخ‌زدگی در شرایط کنترل‌شده

Table 7. Mean comparison of MDA, phenol, protein, DPPH, ascorbate peroxidase (APX) and peroxidase (POX) in lentil genotypes before freezing stress under controlled conditions

| ژنوتیپ Genotype | مالون‌دی‌آلدئید (نانومول بر گرم وزن تر) MDA (nmol gfw ⁻¹) | فنل (میلی گرم بر گرم وزن تر) Phenol (mg gfw ⁻¹) | پروتئین (میلی گرم بر گرم وزن تر) Protein (mg gfw ⁻¹) | مهار رادیکال آزاد (میلی گرم بر گرم وزن تر) DPPH (mg gfw ⁻¹) | آسکوربات پراکسیداز (واحد بر گرم وزن تر) APX (unit gfw ⁻¹) | پراکسیداز (واحد بر گرم وزن تر) POX (unit gfw ⁻¹) |
|--------------------|--|--|---|--|--|---|
| MLC8 | 33.6i-m | 76.6a-e | 3.98n-q | 1.070b-d | 0.027f-h | 15.1f-h |
| MLC9 | 34.6i-m | 63.6b-e | 1.15q | 0.807c-k | 0.018gh | 15.2f-h |
| MLC11 | 36.2h-m | 56.7de | 3.75o-q | 0.513jk | 0.151a | 14.7gh |
| MLC12 | 61.5b-e | 60.7c-e | 2.76pq | 0.855c-j | 0.069b-g | 22.2b-h |
| MLC13 | 55.1c-h | 64.4b-e | 5.79l-p | 0.999b-f | 0.061b-h | 14.3h |
| MLC16 | 50.0c-j | 67.7a-e | 7.06j-o | 0.556h-k | 0.048e-h | 29.9ab |
| MLC17 | 22.9lm | 63.4b-e | 5.77l-p | 0.557h-k | 0.036f-h | 27.9a-c |
| MLC22 | 37.2h-m | 67.1a-e | 10.50f-j | 0.700e-k | 0.029f-h | 18.5d-h |
| MLC29 | 47.7d-k | 56.3de | 11.90f-h | 0.672f-k | 0.036f-h | 18.2d-h |
| MLC31 | 23.7lm | 67.0a-e | 12.00fg | 0.532i-k | 0.035f-h | 14.1h |
| MLC33 | 23.0lm | 59.5de | 16.40de | 0.734d-k | 0.042f-h | 15.2f-h |
| MLC38 | 25.3lm | 54.3e | 19.70cd | 0.685f-k | 0.062b-h | 16.9d-h |
| MLC47 | 42.1e-l | 64.0b-e | 19.70cd | 0.840c-k | 0.045f-h | 21.6c-h |
| MLC55 | 42.2e-l | 73.9a-e | 19.80cd | 0.734d-k | 0.062b-h | 18.5d-h |
| MLC61 | 76.4ab | 70.5a-e | 41.20a | 1.040b-e | 0.115a-c | 25.4a-d |
| MLC70 | 58.2c-f | 82.3a-e | 22.90bc | 1.000b-f | 0.058b-h | 18.9d-h |
| MLC71 | 27.0lm | 57.6de | 24.90b | 0.510k | 0.078b-g | 16.9d-h |
| MLC74 | 29.9k-m | 68.8a-e | 17.10de | 0.883c-h | 0.037f-h | 18.3d-h |
| MLC81 | 31.5i-m | 62.9c-e | 6.32k-p | 0.553h-k | 0.063b-h | 24.1a-e |
| MLC83 | 51.4c-i | 63.0c-e | 12.80f | 0.890c-h | 0.060b-h | 19.7c-h |
| MLC84 | 39.9f-m | 65.5a-e | 11.00f-i | 0.947b-f | 0.053c-h | 21.6c-h |
| MLC91 | 35.6h-m | 61.7c-e | 8.12h-m | 0.917c-g | 0.052c-h | 16.5e-h |
| MLC95 | 29.6k-m | 81.7a-e | 11.70f-h | 1.499a | 0.050d-h | 21.1c-h |
| MLC103 | 20.6m | 82.6a-e | 11.50f-h | 0.742d-k | 0.064b-g | 18.9d-h |
| MLC151 | 85.5a | 57.3de | 9.15f-l | 0.687f-k | 0.053c-h | 17.9d-h |
| MLC163 | 76.6ab | 68.8a-e | 6.43k-p | 1.130bc | 0.043f-h | 16.4e-h |
| MLC169 | 62.8b-d | 85.7a-d | 16.10e | 0.863c-i | 0.083b-f | 30.3a |
| MLC253 | 38.3g-m | 61.9c-e | 9.90f-k | 0.587g-k | 0.113a-d | 19.5d-h |
| MLC286 | 54.9c-h | 71.0a-e | 8.25g-m | 0.812c-k | 0.118ab | 19.2d-h |
| MLC303 | 42.0e-l | 85.4a-d | 5.51l-p | 0.566h-k | 0.084b-f | 19.1d-h |
| MLC334 | 51.0c-j | 85.7a-d | 11.40f-h | 1.07b-d | 0.146a | 23.2a-g |
| MLC337 | 36.6h-m | 60.1de | 8.32g-m | 0.708e-k | 0.075b-g | 23.5a-f |
| MLC394 | 31.2j-m | 94.7a | 12.60f | 1.070b-d | 0.110a-e | 21.9b-h |
| MLC407 | 47.8d-k | 90.4a-c | 8.66g-m | 0.958b-f | 0.048e-h | 17.6d-h |
| MLC409 | 28.5k-m | 93.2ab | 7.64i-n | 1.280ab | 0.063b-h | 21.4c-h |
| MLC410 | 31.5i-m | 80.3a-e | 5.69l-p | 0.555h-k | 0.077b-g | 22.1b-h |
| MLC454 | 31.4i-m | 84.5a-e | 6.31k-p | 0.575h-k | 0.065b-g | 18.2d-h |
| MLC458 | 67.5bc | 85.2a-d | 5.26m-p | 0.782d-k | 0.082b-g | 19.5d-h |
| MLC469 | 38.1g-m | 66.8a-e | 7.23j-o | 0.763d-k | 0.039f-h | 18.3d-h |
| MLC472 | 57.1c-g | 74.8a-e | 7.10j-o | 1.070b-d | 0.044f-h | 15.2f-h |

میانگین‌هایی، در هر ستون، که دارای حداقل یک حرف مشترک می باشند بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی دار ندارند.

Means, in each column, followed by at least one letter in common are not significantly different at the 5% probability level-using Duncan's Multiple Range Test.

تجزیه رگرسیون گام به گام جهت پیش بینی صفات توجیه کننده درصد بقا در ژنوتیپ‌های عدس تحت تنش یخزدگی نشان داد که مالون‌دی‌آلدئید یکی از عوامل موثر در درصد بقا در این مطالعه بوده و تأثیر منفی بر بقای ژنوتیپ‌های عدس داشته است (جدول ۸). بنابراین می‌توان عنوان کرد که مالون‌دی‌آلدئید یکی از صفات مهم در ارزیابی تحمل به یخزدگی در عدس می‌باشد.

همبستگی منفی و معنی‌داری ($r = -0.23^*$) بین درصد بقا و محتوای مالون‌دی‌آلدئید در دمای ۱۳- درجه سانتی‌گراد وجود داشت (جدول‌های ۳ و ۴). وجود رابطه منفی بین مقاومت به سرما و محتوای مالون‌دی‌آلدئید در ژنوتیپ‌های جو نیز گزارش شده است. به عبارتی ژنوتیپ‌های مقاوم به سرما از کمترین مقدار این متابولیت برخوردارند (Valizadeh Kamran *et al.*, 2015). بررسی

جدول ۸- تجزیه رگرسیون گام به گام برای پیش بینی صفات توضیح دهنده درصد بقا در ژنوتیپ‌های عدس قبل از تنش یخزدگی

Table 8. Stepwise regression analysis for prediction of traits explaining survival of lentil genotypes before freezing stress

| Trait | صفات | درصد بقا | | |
|------------------|-----------------|------------------------|---------------------|-------------------|
| | | ضریب | بتای خطای استاندارد | سطح احتمال |
| | | Coefficient | Standard error beta | Probability level |
| Intercept | عرض از مبدا | -5.68 | - | 0.203 |
| Shoot dry weight | وزن خشک شاخه | 1.83 | 0.931 | <0.0001 |
| Chb | کلرئیل b | 33.80 | 0.052 | 0.004 |
| Protein contend | میزان پروتئین | -0.15 | -0.029 | 0.107 |
| MDA | مالون دی آلوئید | -0.09 | -0.042 | 0.024 |
| | | R ² = 0.882 | | P < 0.001 |

بررسی همبستگی معنی‌داری بین میزان فنل و درصد بقا مشاهده نشد. اما وجود رابطه مثبت و معنی‌دار این صفت با رنگیزه‌های کل و ارتباط مثبت بین محتوای رنگیزه‌های فتوستتزی گیاه با تحمل تنش یخزدگی (جدول‌های ۳ و ۴) می‌تواند نشان دهنده تأثیر مثبت این صفات فیزیولوژیکی در بهبود تحمل به تنش در ژنوتیپ‌ها باشد.

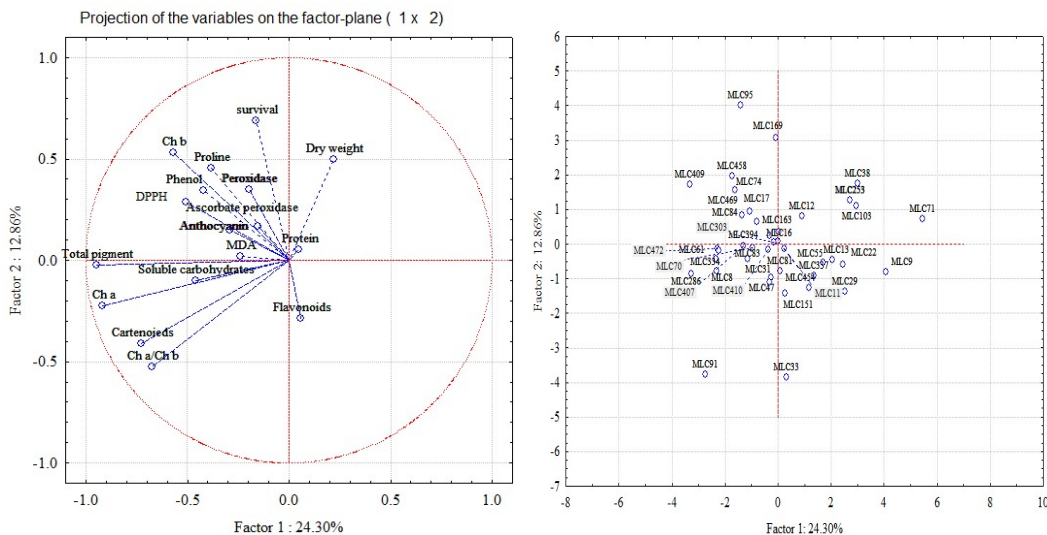
نتایج نشان دهنده تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها از لحاظ میزان فنل بود (جدول ۶). دامنه تغییرات میزان فنل از ۵۴/۳ در ژنوتیپ MLC38 تا ۹۴/۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در ژنوتیپ MLC394 متغیر بود (جدول ۷). هرچند نقش ترکیبات فنلی به‌عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در حذف رادیکال‌های آزاد و افزایش تحمل به تنش شناسایی شده است، اما در این

در گرم بین بیشترین و کمترین مقدار پروتئین متغیر بود (جدول ۷). اما همبستگی معنی‌داری بین مقدار پروتئین با سایر صفات اندازه‌گیری شده قبل از یخ‌زدگی و همچنین با درصد بقا و وزن خشک مشاهده نشد (جدول‌های ۳ و ۴).

تجزیه رگرسیون گام به گام جهت پیش‌بینی صفات توضیح دهنده درصد بقا در ژنوتیپ‌های عدس قبل از تنش یخ‌زدگی نیز نشان داد که میزان پروتئین محلول اثر منفی معنی‌داری بر درصد بقا در ژنوتیپ‌های عدس داشت (جدول ۸). بررسی آزمون تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که پروتئین محلول در هیچ یک از دو بُعد موثر در بقای ژنوتیپ‌ها قرار نگرفت و ژنوتیپ‌های موجود در بخش پروتئین محلول در نمودار بای‌پلات نیز در گروه متحمل به یخ‌زدگی تجزیه خوشه‌ای قرار نگرفتند (شکل ۲ و ۳).

اگرچه در این مطالعه تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ از نظر میزان فلاونوئید (جدول ۶) و همچنین همبستگی معنی‌داری بین میزان فلاونوئید و میزان تحمل به تنش یخ‌زدگی مشاهده نشد (جدول‌های ۳ و ۴)، اما نقش فلاونوئیدها به‌عنوان اصلی‌ترین و پیچیده‌ترین زیر گروه پلی‌فنل‌ها در مهار پراکسیداسیون لیپید در شرایط تنش توسط سایر محققان نیز گزارش شده است (Di Ferdinando *et al.*, 2012).

از نظر میزان پروتئین محلول بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه عدس در شرایط خوسرما شده قبل از اعمال تنش یخ‌زدگی تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۶). محتوای پروتئین برگ در ژنوتیپ‌های عدس از دامنه تنوع گسترده‌ای از ۱/۱۵ (MLC9) تا ۴۱/۲ (MLC61) میلی‌گرم



شکل ۳- بای‌پلات بر مبنای دو مؤلفه اصلی اول و دوم برای ژنوتیپ‌های عدس

Fig. 3. Biplot based on two main principal components for lentil genotypes

نتایج حاصل از تجزیه واریانس آنزیم‌های آنتی اکسیدانتهی شامل آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز حاکی از تفاوت معنی‌دار این صفات در ژنوتیپ‌های مختلف عدس بود (جدول ۶). نتایج به ترتیب نشان دهنده تفاوت هشت برابری بین بیشترین (MLC334) و کمترین (MLC9) مقدار آسکوربات پراکسیداز و تفاوت دو برابری در بیشترین (MLC169) و کمترین (MLC31) مقدار پراکسیداز بود (جدول ۷). در میان ژنوتیپ‌های عدس مورد مطالعه ۳۸ درصد آنها از مقدار آسکوربات پراکسیداز کمتر از ۰/۰۵ واحد در گرم وزن تر برخوردار بودند و محتوای آنزیم پراکسیداز چهار درصد کمتر از مقدار میانگین بود (جدول ۷). این نتایج تایید کننده وجود رابطه مثبت بین مقدار آنزیم‌های آنتی اکسیدانتهی آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه می‌باشد (جدول‌های ۳ و ۴).

بررسی آزمون تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که آنزیم‌های آنتی اکسیدانتهی آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در بُعد دوم نمودار بای پلات قرار گرفتند و بر اساس تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های گروه پنجم که متحمل به تنش یخ‌زدگی بودند نیز عمدتاً در این بُعد قرار گرفتند (شکل ۲ و ۳). فعالیت آسکوربات پراکسیداز به‌عنوان قسمتی از سامانه آنتی اکسیدانتهی، سلول را در مقابل گونه‌های فعال اکسیژن محافظت کرده و از تجمع پراکسید هیدروژن ممانعت می‌کند

نتایج نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین ژنوتیپ‌های عدس از نظر میزان فعالیت مهار رایکال آزاد (DPPH) بود (جدول ۶). دامنه محتوای این صفت از ۰/۵۱۰ در ژنوتیپ MLC71 تا ۱/۴۹۹ میلی گرم در گرم ماده تر در ژنوتیپ MLC95 متغیر بود (جدول ۷). ارتباط مثبت و معنی‌داری بین این صفت با درصد بقا گیاهچه‌های عدس در دماهای یخ‌زدگی مشاهده نشد. تنها در دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد بین این صفت با وزن خشک نهایی گیاهچه‌ها ارتباط منفی و معنی‌داری وجود داشت. همچنین این صفت با غلظت کلروفیل a، کلروفیل b و کل رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی همبستگی مثبت و معنی‌داری نشان داد (جدول‌های ۳ و ۴).

بررسی میانگین و انحراف از میانگین گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای برای صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های عدس نشان داد که ژنوتیپ‌های گروه پنجم با درصد بقای بالاتر از میانگین فعالیت مهار رایکال آزاد (DPPH) بیشتری نسبت به سایر گروه‌ها برخوردار می‌باشند (شکل ۲ و جدول ۵). آزمون تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نیز نشان داد که فعالیت مهار رایکال آزاد (DPPH) در بُعد دوم قرار گرفت و عمده ژنوتیپ‌های این بُعد در گروه متحمل به یخ‌زدگی قرار گرفتند (شکل ۳). به‌طور کلی فعالیت مهار رایکال آزاد (DPPH) می‌تواند به‌عنوان یک سامانه آنتی اکسیدانتهی نقش مهمی را در مقابله گیاه با تنش یخ‌زدگی ایفا کند.

(Gill and Tuteja, 2010).

سرما، به‌عنوان شاخصی برای انتخاب گیاهان متحمل به تنش مورد استفاده قرار می‌گیرد. مقایسه میانگین حاصل از اثر تنش یخ‌زدگی نشان داد که ۴۰ درصد (۱۶ ژنوتیپ) از ژنوتیپ‌ها از بقای بیش از ۸۰ درصد برخوردار بودند (جدول ۱۰).

از میان این ژنوتیپ‌ها، شش ژنوتیپ (MLC8، MLC74، MLC84، MLC95، MLC409 و MLC472) براساس تجزیه خوشه‌ای در گروه پنجم قرار گرفتند که از درصد بقای بالاتری نسبت به سایر گروه‌ها نیز برخوردار بودند (جدول ۵). همچنین ۱۰ ژنوتیپ از میان ژنوتیپ‌های دارای بقای بالای ۸۰ درصد از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی مطلوبی نیز براساس نتایج تجزیه خوشه‌ای برخوردار بودند که این نتایج تایید کننده رابطه مستقیم بین درصد بقا با صفات بیوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی گیاه می‌باشد (جدول ۵ و شکل ۲).

آنزیم آسکوربات پراکسیداز باعث شکسته شدن پراکسید هیدروژن به آب و مولکول اکسیژن شده و به عبارتی پراکسید هیدروژن تولید شده را از طریق چرخه آسکوربات-گلوتاتیون سم‌زدایی می‌کند و مانند یک پیام‌رسان مولکولی می‌تواند تجمع پراکسید هیدروژن را تنظیم کند (Muthuramalingam *et al.*, 2013). نقش این آنزیم در افزایش تحمل به تنش یخ‌زدگی در لویا (*Phaseolus vulgaris* L.) گزارش شده است (Soliman *et al.*, 2018).

تجزیه واریانس داده‌ها برای درصد بقا و وزن خشک شاخ و برگ نشان داد که اثر ژنوتیپ، دما و اثر متقابل آنها معنی‌دار بود (جدول ۹). ارزیابی خسارت از طریق اندازه‌گیری درصد بقا پس از قرار گرفتن آن در معرض دماهای یخ‌زدگی و همچنین ارتباط احتمالی آن با سایر صفات قبل از بروز تنش

جدول ۹- تجزیه واریانس برای درصد بقا و وزن خشک شاخه و برگ ژنوتیپ‌های عدس پس از اعمال یخ‌زدگی در شرایط کنترل شده

Table 9. Analysis of variance for survival percentage and shoot dry weight of lentil genotypes after freezing stress under controlled conditions

| S.O.V. | منبع تغییر | درجه آزادی df | درصد بقا Survival (%) | وزن خشک شاخه Shoot dry weight |
|-----------------|-------------------|------------------|--------------------------|----------------------------------|
| Genotype (G) | ژنوتیپ | 39 | 94771** | 135.0** |
| Temperature (T) | دما | 2 | 1483** | 2965.0** |
| G × T | ژنوتیپ × دما | 78 | 945** | 110.0** |
| Error | خطا | 240 | 475 | 14.8 |
| C.V. (%) | درصد ضریب تغییرات | - | 29.3 | 25.3 |

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

** Significant at the 1% of probability level.

جدول ۱۰- درصد بقا و وزن خشک شاخ و برگ ژنوتیپ‌های عدس پس از اعمال یخ‌زدگی در شرایط کنترل‌شده

Table 10. Survival percentage and shoot dry weight of lentil genotypes after freezing stress under controlled conditions

| ژنوتیپ Genotype | درصد بقا Survival (%) | وزن خشک شاخه (میلی گرم بر گیاه) Shoot dry weight (mg.plant ⁻¹) |
|--------------------|--------------------------|---|
| MLC8 | 83.3b-d | 11.3k-m |
| MLC9 | 50.0hi | 16.9e-g |
| MLC11 | 94.4ab | 19.7cd |
| MLC12 | 100.0a | 24.2b |
| MLC13 | 66.7e-g | 19.0c-e |
| MLC16 | 66.7e-g | 15.7gh |
| MLC17 | 100.0a | 16.2f-h |
| MLC22 | 62.5f-h | 16.3f-h |
| MLC29 | 58.3g-i | 8.48no |
| MLC31 | 66.7e-g | 15.7gh |
| MLC33 | 66.7e-g | 13.0i-k |
| MLC38 | 96.7ab | 10.1c-e |
| MLC47 | 73.6d-f | 12.6jk |
| MLC55 | 66.7e-g | 13.1i-k |
| MLC61 | 59.7f-h | 14.1h-j |
| MLC70 | 66.7e-g | 10.9k-n |
| MLC71 | 66.7e-g | 12.5jk |
| MLC74 | 91.7a-c | 24.2b |
| MLC81 | 66.7e-g | 9.85l-n |
| MLC83 | 52.8g-i | 15.5g-i |
| MLC84 | 91.7a-c | 14.1h-j |
| MLC91 | 44.4i | 6.17o |
| MLC95 | 100.0a | 15.5g-i |
| MLC103 | 83.3b-d | 11.8j-l |
| MLC151 | 54.2g-i | 14.1h-j |
| MLC163 | 66.7e-g | 14.2h-j |
| MLC169 | 88.9a-c | 24.4b |
| MLC253 | 86.1a-d | 28.2a |
| MLC286 | 73.3d-f | 12.8jk |
| MLC303 | 80.0c-e | 12.3j-l |
| MLC334 | 58.3g-i | 8.57no |
| MLC337 | 58.3g-i | 18.3d-f |
| MLC394 | 66.7e-g | 9.2mn |
| MLC407 | 79.2c-e | 11.2k-m |
| MLC409 | 96.7ab | 15.8f-h |
| MLC410 | 92.5a-c | 17.4d-g |
| MLC454 | 58.3g-i | 16.9e-g |
| MLC458 | 91.7a-c | 21.4c |
| MLC469 | 66.7e-g | 12.0j-l |
| MLC472 | 83.3b-d | 14.2h-j |

میانگین‌هایی، در هر ستون، که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند براساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی دار ندارند.

Means, in each column, followed by at least one letter in common are not significantly different at the 5% probability level- using Duncan's Multiple Range Test.

صفات مورد مطالعه (به جز در مورد درصد بقا، کلروفیل a و کلروفیل b) نسبت به میانگین کل بود (جدول ۵). بعد از گروه چهارم نیز، ژنوتیپ‌های متعلق به گروه پنجم از بیشترین برتری نسبت به میانگین کل برخوردار بودند. این نتایج نشان دهنده مناسب‌تر بودن این ژنوتیپ‌ها جهت استفاده از صفات برتر آن‌ها برای تحمل به سرمای زمستان در برنامه‌های به‌نژادی عدس می‌باشد.

آزمون تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) و ترسیم بای‌پلات نشان داد که مولفه اول ۲۴/۳۰ درصد از تغییرات صفات شامل صفات کلروفیل a، کاروتنوئیدها، نسبت کلروفیل a/b، غلظت کل رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی و کربوهیدرات‌های محلول را شامل شد. مولفه دوم صفات مالون‌دی‌آلدئید، آنتوسیانین، آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز، مهار رادیکال آزاد DPPH، پرولین، فنل کل، کلروفیل b و درصد بقا را با ۱۲/۸۶ درصد توضیح داد (شکل ۳). در واقع این بُعد از نمودار ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و متابولیتی را دربر دارد. بنابراین ژنوتیپ‌هایی که دارای PCA1 پایین‌تری هستند از نظر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و متابولیت‌ها وضعیت مناسب‌تری دارند.

ژنوتیپ‌های MLC458، MLC469، MLC409، MLC74، MLC84، MLC169، MLC394، MLC95، MLC17، MLC163 و MLC303 از نظر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و متابولیت‌ها نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها از وضعیت

تنها پنج ژنوتیپ توانستند ماده خشک بیشتر از ۲۰ میلی‌گرم بر گیاه تولید کنند (جدول ۱۰). هرچند در برخی مطالعات اندازه‌گیری صفات مربوط به رشد مجدد گیاه نظیر وزن خشک به عنوان شاخصی برای تعیین میزان تحمل گیاهان به تنش مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما در این بررسی اگرچه بر اساس تجزیه گام به گام رابطه بین وزن خشک و درصد بقای گیاهان مثبت بود (جدول ۸). اما براساس نتایج حاصل از نمودار بای‌پلات وزن خشک نهایی گیاه در هیچ یک از دو بُعد موثر بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و رنگیزه‌ای ژنوتیپ‌ها قرار نگرفت (شکل ۳).

تجزیه رگرسیونی گام به گام با وارد کردن کلیه صفات اندازه‌گیری شده به مدل رگرسیونی انجام گردید و صفاتی که بیشترین اثر معنی‌دار بر درصد بقا داشتند، مشخص شدند (جدول ۸). در این میان وزن خشک بوته و غلظت کلروفیل b اثر مثبت و معنی‌دار و مالون‌دی‌آلدئید تأثیر منفی معنی‌دار بر روی درصد بقا ژنوتیپ‌های عدس داشتند (جدول ۸). بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌ها در پنج گروه مجزا از هم تفکیک شدند. به ترتیب ۵، ۸، ۱۱ و ۱۱ ژنوتیپ، در گروه‌های اول تا پنجم قرار گرفتند (شکل ۲). مقایسه میانگین گروه‌ها با میانگین کل نشان داد که درصد بقا در گروه‌های اول و پنجم نسبت به میانگین کل برتری داشت و در سایر گروه‌ها پایین‌تر از میانگین کل بود. به‌طور کلی نتایج نشان دهنده برتری نسبی ژنوتیپ‌های گروه چهارم در اکثر

صفات آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد. نتایج خوشه‌بندی و مقایسه میانگین گروه‌ها نیز نشان دهنده تحمل به سرما مناسب‌تر در ژنوتیپ‌های متعلق به گروه اول و پنجم بود. همچنین تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نیز نشان داد که ژنوتیپ‌های متحمل به یخ‌زدگی در دو بُعد نمودار بای‌پلات قرار گرفتند که بیشترین میزان تغییرات را توضیح دادند.

به طور کلی ژنوتیپ‌های متحمل به دو گروه تقسیم شدند که یک گروه از نظر رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی پتانسیل بالاتری داشتند و گروه دیگر از نظر متابولیت‌ها و ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانتی سازگار موفق‌تری دارا بودند. بنابراین براساس نتایج حاصل از این پژوهش به نظر می‌رسد که این شاخص‌ها قبل از اعمال تنش سرما اهمیت بیشتری در پیش‌بینی تأثیر سرما بر درصد بقا ژنوتیپ‌های عدس دارند.

سپاسگزاری

هزینه اجرای این پژوهش از محل طرح پژوهشی مصوب با کد ۴۸۰۲۱ در معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد تأمین شده است که بدین وسیله سپاسگزاری می‌شود.

مناسب‌تری برخوردار بودند. از طرف دیگر ژنوتیپ‌های MLC47، MLC410، MLC70، MLC31، MLC91، MLC8، MLC286، MLC407 و MLC61، MLC472 و MLC83 و MLC334 از نظر ظرفیت رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی از وضعیت مطلوبی داشتند (شکل ۳).

بررسی آزمون تجزیه به مؤلفه‌های اصلی همراه با نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان داد که اکثر ژنوتیپ‌های موجود در بُعد اول و دوم در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در گروه‌های چهارم و پنجم در تجزیه خوشه‌ای قرار دارند. با توجه به این نتایج ممکن است استنباط شود که ژنوتیپ‌های عدس که قادر به حفظ بقای خود در شرایط تنش یخ‌زدگی بودند از سازگار فعالیت آنتی‌اکسیدانی و غلظت متابولیت‌ها و همچنین رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی بالاتری برخوردار بودند. بنابراین این ویژگی‌ها می‌تواند در گزینش بهتر ژنوتیپ‌های متحمل به یخ‌زدگی عدس موثر باشند.

نتایج این پژوهش نشان دهنده تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از لحاظ صفات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. همبستگی مناسبی بین محتوای کلروفیل b، پروتئین محلول و مالون‌دی‌آلدئید با درصد بقا در مقایسه سایر

References

- Abe, N., Murata, T., and Hirota, A. 1998. Novel 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl-radical scavengers, bisorbicillin and demethyltrichodimerol, from a fungus. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* 62 (4): 61-662.

- Ahmed, N. U., Park, J. I., Jung, H. J., Hur, Y., and Nou, I. S. 2015.** Anthocyanin biosynthesis for cold and freezing stress tolerance and desirable color in *Brassica rapa*. *Functional and Integrative Genomics* 15 (4): 383-394.
- Apostolova, P., Yordanova, R., and Popova, L. 2008.** Response of antioxidative defense system to low temperature stress in two wheat cultivars. *General and Applied Plant Physiology* 34 (3-4): 281-294.
- Atici, O., and Nalbantoglu, B. 2003.** Antifreeze proteins in higher plants. *Phytochemistry* 64: 1187-1196.
- Awasthi, R., Bhandari, K., and Nayyar, H. 2015.** Temperature stress and redox homeostasis in agricultural crops. *Frontiers in Environmental Science* 3 (11): 1-24.
- Bagheri, A. R. Nezami, A., and Hojjat, S. S. 2004.** Evaluation of cold tolerance in lentil for fall planting in the highlands of Iran. Final report of research project. Ferdowsi University of Mashhad. (in Persian). 187 pp.
- Balamurugan, S., Ann, J. S., Varghese, I. P., Murugan. Sh. M., Harish, M. Ch., Kumar, S. R., and Sathishkumar, R. 2018.** Heterologous expression of *Lolium perenne* antifreeze protein confers chilling tolerance in tomato. *Journal of Integrative Agriculture* 17 (5): 1128–1136.
- Barrios, A., Aparicio, T., J. Rodriguez, M., Perez de la Vega, M., and Caminero, C. 2016.** Winter sowing of adapted lines as a potential yield increase strategy in lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Spanish Journal of Agricultural Research* 14 (2): 1-8.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., and Teare, I. D. 1973.** Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39 (1): 205-207.
- Bradford, M. M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2): 248-254.
- Caverzan, A., Casassola, A., and Patussi Brammer, S. 2016.** Antioxidant responses of wheat plants under stress. *Genetics and Molecular Biology* 39 (1): 1-6.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., and Chern, J. C. 2002.** Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal*

- of Food and Drug Analysis 10 (3): 178-182
- Davey, M. W., Stals, E., Panis, B., Keulemans, J., and Swennen, R. I. 2005.** High throughput of malondialdehyde in plant. *Analytical Biochemistry* 347: 201-207.
- Dere, S., Gines, T., and Sivaci, R. 1998.** Spectrophotometric determination of chlorophyll - a, b and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Turkish Journal of Botany* 22 (1): 13-17.
- Di Ferdinando, M., Brunetti, C., Fini, A., and Tattini, M. 2012.** Flavonoids as antioxidants in Plants under abiotic stresses. pp. 159–179. In: Ahmad, P., Prasad, M. N. V. (Eds.) *Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability*. Springer, New York.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. 1951.** A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* 168 (4265): 167-167.
- Duman, J. G., and Wisniewski, M. J. 2014.** The use of antifreeze proteins for frost protection in sensitive crop plants. *Environmental and Experimental Botany* 106: 60–69.
- FAO. 2017.** Crop production statistics. Food and Agriculture Organization of United National, Rome, Italy (<http://www.fao.org/faostat>).
- Gholami Rezvani, N., Nezami, A., Kafi, M., and Nabati, J. 2019.** Evaluation of lentil (*Lens culinaris*) genotypes for autumn sowing in cold temperate regions under field conditions. *Journal of Plant Production* 11 (4): 142-147. (in Persian)
- Gill, S. S., and Tuteja, N. 2010.** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Gusta, L. V., and Wisniewski, M. 2013.** Understanding plant cold hardiness: an opinion. *Physiologia Planarum* 147: 4–14.
- Heath, R. L., and Packer, L. 1968.** Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125 (1): 189-198.
- Hincha, D. K., and Zuther, E. 2020.** Introduction: plant cold acclimation and winter survival. *Methods in Molecular Biology* 2156: 1-7.
- Hojjat, S. S., and Galstyan, M. H. 2014.** Study of economic-ecological results of cold

- resistance sort of the Lentil world collection under highlands of Islamic Republic of Iran. *International Journal of Agriculture and Crop Science* 7 (14): 1364-1370.
- Hojjat, S. S., Bagheri, A. R., and Nezami, A. 2007.** Evaluation of lentil germplasm for cold tolerance for fall planting in highlands of Iran. *Journal of Agriculture Science* 1: 19-31.
- Homer, A., Sahin, M., and Kucukozydemir, U. 2016.** Evaluation of pea (*Pisum sativum* L.) germplasm for winter hardiness in central Anatolia, Turkey, using field and controlled environment. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 52 (2): 55–63.
- Janmohammadi, M., Enayati, V., and Sabaghnia, N. 2012.** Impact of cold acclimation, de-acclimation and re-acclimation on carbohydrate content and antioxidant enzyme activities in spring and winter wheat. *Icelandic Agricultural Sciences* 25: 3-11.
- Johnson, G. N. 2005.** Cyclic electron transport in C3 plants: fact or artefact? *Journal of Experimental Botany* 56: 407–416.
- Khan, M. I., Iqbal, N., Masood, A., Per, T. S., and Khan, N. A. 2013.** Salicylic acid alleviates adverse effects of heat stress on photosynthesis through changes in proline production and ethylene formation. *Plant Signaling and Behavior* 8 (11), e26374, DOI: 10. 4161/psb26374.
- Kim, S., Lee, S., and Lee, I. 2012.** Alteration of phytotoxicity and oxidant stress potential by metal oxide nanoparticles in *Cucumis sativus*. *Water, Air, and Soil Pollution* 223: 2799-2806.
- Ma, Y., Kuang, L., He, X., Bai, W., Ding, Y., Zhang, Z., Zhao, Y., and Chai, Z. 2010.** Effects of rare earth oxide nanoparticles on root elongation of plants. *Chemosphere* 78: 273-279.
- Miura, K., and Furumoto, T. 2013.** Cold signaling and cold response in plants. *International Journal of Molecular Science* 14 (3): 5312–5337.
- Muthuramalingam, M., Matros, A., Scheibe, R., Mock, H. P., and Dietz, K. J. 2013.** The hydrogen peroxide-sensitive proteome of the chloroplast in vitro and in vivo. *Frontiers in Plant Science* 4: 54.

- Oakley, C. G., Savage, L., Lotz, S., Larson, G. R., Thomashow, M. F., Kramer, D. M., and Schemske, D. W. 2018.** Genetic basis of photosynthetic responses to cold in two locally adapted populations of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 69: 699–709.
- Paredes, M., and Quiles, M. J., 2015.** The effects of cold stress on photosynthesis in Hibiscus plants. *PLoS One* 10 (9): e0137472, DOI: 10.1371/journal. Pone. 0137472.
- Potapovich, A. I., and Kostyuk, V. A. 2003.** Comparative study of antioxidant properties and cytoprotective activity of flavonoids. *Biochemistry (Moscow)* 68 (5): 514–519.
- Pradedova, E. V., Isheeva, O., and Salyaev, R. 2011.** Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 58: 210-217.
- Rahaie, M., Xue, G. P., and Schenk, P. M. 2013.** The role of transcription factors in wheat under different abiotic stresses. pp. 367-385. In: Vahdati, K., and Leslie, C. (eds.) *Abiotic stress - plant responses and applications in agriculture*. InTech, Rijeka, Croatia.
- Saibo, N. J. M., Lourenço, T., and Oliveira, M. M. 2009.** Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of Botany* 103: 609–623.
- Schulz, E., Tohge, T., Zuther, E., R. Fernie, A., and K. Hincha, D. 2016.** Flavonoids are determinants of freezing tolerance and cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*: 1-10.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., and Pessaraki, M. 2012.** Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*: 1-26.
- Singleton, V. L., and Rossi, J. A. 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16 (3): 144-158.
- Soliman, M. H., Alayafi, A. A. M., El Kelish, A. A., and Abu-Elsaoud, A. 2018.**

- Acetylsalicylic acid enhance tolerance of *Phaseolus vulgaris* L. to chilling stress, improving photosynthesis, antioxidants and expression of cold stress responsive genes. *Botanical Studies* 59: 6.
- Sreenivasulu, N., Ramanjulu, S., Ramachandra-Kini, K., Prakash, H., Shekar-Shetty, H., Savithri, H., and Sudhakar, C. 1999.** Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet with differential salt tolerance. *Plant Science* 141 (1): 1-9.
- Thavarajah, D. 2017.** Lentils (*Lens culinaris* L.): Linking whole foods for better human health. Nova Sciences Publishers. 229 pp.
- Valizadeh Kamran, R., Toorchi, M., Moghadam, M., and Mohammadi, H. 2015.** The effect of cold stress on H₂O₂ and MDA contents in barely genotypes. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* 7 (3): 66-75.
- Vitmas, P., Kosova, K., and Musilova, J. 2019.** Relationship between dehydrin accumulation and winter survival in winter wheat and barley grown in the field. *Frontiers in Plant Science* 10: 7. DOI: 10.3389/fpls.2019.0007.
- Wanger, G. J. 1979.** Content and vacuole/ extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin's in protoplast. *Plant Physiology* 64: 88-93.
- Winfield, M. O., Lu, C, Wilson, L. D., Coghill, J. A., and Edwards, K. J. 2010.** Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat. *Plant Biotechnology Journal* 8: 749-771.
- Wisniewski, M., Glenn, D. M., and Fuller, M. P. 2002.** Use of a hydrophobic particle film as a barrier to extrinsic ice nucleation in tomato plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127 (3): 358-364.
- Yamaguchi, K., Mori, H., and Nishimura, M. 1995.** A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant & Cell Physiology* 36 (6): 1157-62.
- Zhang, K. M., Yu, H. J., Shi, K., Zhou, Y. H., Yu, J. Q., and Xia, X. J. 2010.** Photoprotective roles of anthocyanins in *Begonia semperflorens*. *Plant Science* 179 (3), 202-208.